

## 【学位論文審査の要旨】

### 1. 研究の目的

アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患であり、認知症の 50%程度を占める。脳に、線維状タンパク質からなる 2 種類の病理構造物、すなわち、細胞外の老人斑、細胞内の神経原線維変化が出現することが特徴である。老人斑の主要構成成分はアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) であり、細胞膜タンパク質であるアミロイド  $\beta$  前駆体タンパク質 (APP) から  $\beta$ -及び  $\gamma$ -セクレターゼにより切り出されて生じる。また、神経原線維変化の主要構成成分は微小管結合タンパク質のタウである。APP の遺伝子異常によって発症する AD 家系が発見されたことから、 $A\beta$  が AD 発症の原因であるとする「アミロイド仮説」が提唱され、現在まで一般に受け入れられてきた。しかしながら、AD のほとんどが遺伝子変異の無い孤発性であることや、 $A\beta$  蓄積よりもタウ病変 (異常型タウ) の広がり方が臨床症状と強い相関を示すこと、 $A\beta$  ワクチン療法治験の失敗などから、最近ではタウの病態が再び注目されている。現在までに  $A\beta$  とタウの関係について多くの報告がされてきたが、明確な関連は示されていない。近年、異常型タウ (線維化タウ) が正常型タウを異常型に変換して増殖し、それが細胞間を伝わって広がることが培養細胞やマウスのモデルで実験的に示された。エンドサイトーシスや神経回路を介して異常型タウが細胞間を伝播する可能性が示唆されているが、明確な分子機構は不明である。そこで、細胞内タウ蓄積に注目し、 $A\beta$  だけでなく APP とタウの関係について細胞間伝播の観点から検討を行った。

### 2. 研究の方法および結果

はじめに、APP とタウ線維との相互作用を調べる目的で、APP を発現させた SH-SY5Y 細胞に予め試験管内で作製したタウ線維を添加し、免疫組織染色を行った。その結果、添加したタウ線維と APP の共局在が観察された。次に APP の発現が細胞内のタウ蓄積を促進するかどうか調べるため、APP とタウを共発現させた細胞に、タウ線維を添加する実験を行った。タウの単独発現細胞では細胞内にタウ蓄積は確認されなかったが、APP と共発現させた細胞では、AD 様に異常リン酸化、不溶化した細胞内タウの蓄積が観察された。この AD 様の細胞内タウ蓄積は、タウ線維の代わりに AD 患者脳の不溶性画分を添加した細胞でも観察された。さらに、細胞内に発現したタウと細胞外から添加したタウを区別するため、HA タグ付きタウ (HA-タウ) や GFP タグ付きタウ (GFP-タウ) と APP との共発現細胞でさらに実験を行ったところ、タウ線維の添加により、細胞内に発現した HA-タウや GFP-タウが異常リン酸化、不溶化して、細胞内に蓄積することがイムノブロットによる解析により確認された。この結果から、添加したタウ線維でなく、プラスミド由来のタウが異常型に変換され、蓄積したことが判明した。また、免疫電顕観察により、これらの細胞内に蓄積したタウは AD 様の線維状構造をとっていることが確認された。以上の結果から、膜タンパク質である APP が細胞外のタウ線維と相互作用し、細胞内に取り込み、そのタウ線維が正常タウを異常型に変換し線維化して蓄積したと考えられる。

そこでさらに、APP のタウ線維取り込みメカニズムを調べるため、APP の欠損体や種々の変異体を発現してタウ蓄積との関係を調べた。APP の細胞外ドメイン欠損体を発現させた場合には、タウ線維を添加しても細胞内のタウ蓄積は観察されなかった。また、通常、APP はセクレターゼにより切断され細胞外ドメインが切り離されるが、この切断を受けない変異 APP を発現させた場合には、タウ蓄積の増加が観察された。これらの結果から APP の細胞外ドメインの量依存的にタウ線維の取り込み量が増加し、細胞内タウ蓄積が増加することが示唆された。

また、家族性 AD で同定されている APP 変異 (KM690/691NL, V717F, V717G, V717I) についても、変異体をタウと共発現し、タウ線維を添加してタウの蓄積量の解析を行った。その結果、これらの変異 APP を発現させた場合では、野生型 APP を発現させたものと比べてタウの蓄積量に有意な差は認められなかった。また、タウを発現し、 $A\beta$  とタウ線維を添加した細胞を同様にイムノブロット法により解析を行ったが、タウの細胞内蓄積は誘導されなかった。この結果から、 $A\beta$  には APP のようなタウ線維の細胞内取り込み促進効果は無いことが示された。

本研究の結果から、APP には  $A\beta$  産生だけではなく、細胞外の線維化タウの取り込みを促進し、タウ病変を加速させる作用があると考えられる。

### 3. 審査の結果

現在まで、APP から産生される  $A\beta$  の細胞毒性が大きく取り上げられてきた。しかし、本研究では、 $A\beta$  ではなく、APP が細胞外に存在するタウの取り込み促進に働き、細胞内でのタウの線維化促進に働く作用を持つことを示した。AD 患者脳において、細胞内に蓄積したタウが分泌や細胞の死滅によって細胞外へと放出され、そのタウが APP を介して細胞内に取り込まれて症状が進行する可能性がある。したがって、APP を標的とした異常型タウの細胞間伝播制御という認知症に対する新しい創薬も期待される独創的な研究であると言える。これらの研究成果はすでに国際雑誌にも発表され、国際的にも高く評価されており、本論文は博士（理学）の学位に十分値するものと判定した。

### 4. 試験および試問の結果

本学の学位規定にしたがって、試験および試問を行った。公開の席上で論文内容の発表を行い、生物科学専攻教員による質疑応答をもって試験とした。また、論文審査委員による本論文および関連分野の試問を行った。その結果、専門科目および外国語について十分な学力があることを認め合格と判定した。